

ESTROGEN RECEPTOR GENE AND ITS UTILIZATION

Patent Number: JP2000201688
Publication date: 2000-07-25
Inventor(s): OSHITA HIROBUMI;; JO MEIKYOKU
Applicant(s): SUMITOMO CHEM CO LTD
Requested Patent: JP2000201688
Application: JP19990098787 19990406
Priority Number(s):
IPC Classification: C12N15/09; C07K14/72; C12N5/10; C12P21/02;
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new gene for production, etc., of an estrogen receptor useful for an examination system, etc., for measuring estrogenic action and comprising an estrogen receptor gene encoding a protein having a specific amino acid sequence.

SOLUTION: This estrogen receptor gene encodes a protein having an amino acid sequence represented by the formula. The gene is useful for examination system, etc., for evaluating estrogen receptor activation ability of a chemical substance as a method for measuring estrogenic action of the chemical substance which is feared to get off human hormone balance and cause diseases. The gene is obtained by extracting RNA according to ordinary method from a killifish such as killifish for appreciation, reacting the RNA with a reverse transcriptase to synthesize cDNA, preparing cDNA library by using the cDNA and screening the cDNA library by hybridization method with a probe comprising a partial sequence.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-201688
(P2000-201688A)

(43)公開日 平成12年7月25日(2000.7.25)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 12 N 15/09	Z NA	C 12 N 15/00	Z NAA 4 B 0 2 4
C 07 K 14/72		C 07 K 14/72	4 B 0 6 3
C 12 N 5/10		C 12 P 21/02	C 4 B 0 6 4
C 12 P 21/02		C 12 Q 1/02	4 B 0 6 5
C 12 Q 1/02		C 12 N 5/00	B 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数12 O.L (全 23 頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平11-98787

(22)出願日 平成11年4月6日(1999.4.6)

(31)優先権主張番号 特願平10-319465

(32)優先日 平成10年11月10日(1998.11.10)

(33)優先権主張国 日本 (JP)

(71)出願人 000002093

住友化学工業株式会社

大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

(72)発明者 大下 博文

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ

クノサービス株式会社内

(72)発明者 徐 明旭

兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号 住化テ

クノサービス株式会社内

(74)代理人 100093285

弁理士 久保山 隆 (外1名)

最終頁に統く

(54)【発明の名称】 エストロジエンレセプター遺伝子およびその利用

(57)【要約】

【課題】 化学物質のエストロジエン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するための試験系を提供可能とするこ

と。

【解決手段】 配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジエンレセプター遺伝子等。

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジエンレセプター遺伝子。

【請求項2】配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするエストロジエンレセプター遺伝子。

【請求項3】配列番号2で示される塩基配列を有するエストロジエンレセプター遺伝子。

【請求項4】配列番号1で示される塩基配列からなるエストロジエンレセプター遺伝子。

【請求項5】請求項1～4記載のエストロジエンレセプター遺伝子を含有するベクター。

【請求項6】エストロジエンレセプター遺伝子に宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で結合されてなる請求項5記載のベクター。

【請求項7】請求項1～6記載のエストロジエンレセプター遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項8】請求項5または6記載のベクターが宿主細胞に導入されてなる形質転換体。

【請求項9】宿主細胞が動物細胞である請求項7または8記載の形質転換体。

【請求項10】請求項7～9記載の形質転換体を培養してエストロジエンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロジエンレセプターの製造方法。

【請求項11】配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロジエンレセプター。

【請求項12】化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロジエン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と請求項1～4記載のエストロジエンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロジエンレセプター活性化能の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、エストロジエンレセプター遺伝子およびその利用に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】近年、環境中の幾つかの化学物質がエストロジエン様作用を示すことが報告されている。かかる化学物質の作用はヒトのホルモンバランスを崩し、疾患の原因となることが危惧されることから、化学物質の安全性評価の一環として化学物質のエストロジエン様作用を測定する試みがなされている。エストロジエンの作用機序として、エストロジエンがエストロジエンの標的細胞に存在するエストロジエンレセプターに結合すると、該レセプターは活性化され、染色体上のエストロジエン応答配列に結合して該配列の下流に在する遺伝子の発現を促進する。そこで、化学物質のエストロジエン様作用を測定するための方法として、化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するための試験系の開発が切望されている。

【0003】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、水生動物のモデル動物であるメダカのエストロジエンレセプターをコードする遺伝子を見出し、本発明に至った。即ち、本発明は、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードするエストロジエンレセプター遺伝子（以下、本発明遺伝子と記す。）、配列番号3で示されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする該遺伝子、配列番号2で示される塩基配列を有する該遺伝子、配列番号4で示される塩基配列からなる該遺伝子、該遺伝子を含有するベクター（以下、本発明ベクターと記す。）、該遺伝子が宿主細胞に導入されてなる形質転換体（以下、本発明形質転換体と記す。）、該形質転換体を培養してエストロジエンレセプターを産生させ、これを回収することを特徴とするエストロジエンレセプターの製造方法、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するエストロジエンレセプター、化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するためのレポーターアッセイにおいて、エストロジエン応答配列を含む転写制御領域の下流に連結されたレポーター遺伝子と本発明遺伝子とがエストロジエンレセプター非内在性宿主細胞に導入されてなる形質転換体に、化学物質を作用させることを特徴とする化学物質のエストロジエンレセプター活性化能の評価方法、を提供するものである。

【0004】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明遺伝子は、例えば、ヒメダカ等のメダカから、J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著；モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的方法に準じて取得することができる。具体的には、まず、ヒメダカ等のメダカからRNAを調製する。例えは、ヒメダカの内臓を塩酸グアニジンやグアニジンチオシアネート等の強力な蛋白質変性剤を含む溶液中で粉碎し、さらに該粉碎物にフェノール、クレオホルム等を加えることにより蛋白質を変性させる変性蛋白質を遠心分離等により除去した後、回収された可溶性画分から、塩酸グアニジン・フェノール法、SDS-フェノール法、グアニジンチオシアネート-CSC-1法等の方法により全RNAを抽出する。なお、これらの方法に基づいた市販のRNA調製用キットとしては、例えばISOGEN（ニッポンジーン製）がある。得られた全RNAを鉄型として使用し、該RNAにオリゴdTプラ

イマーをアニールさせた後に逆転写酵素を作用させることにより一本鎖cDNAを合成し、次いで、該一本鎖cDNAに大腸菌RNAse Hおよび大腸菌のDNAポリメラーゼIを作用させて二本鎖のcDNAを合成する。更に該cDNAの両末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑化する。得られたcDNAはフェノールークロロホルム抽出、エタノール沈殿等の通常の方法により精製し、回収する。なお、これらの方針に基づいた市販のcDNA合成用キットとしては、例えばcDNA合成システムプラス（アマシャム社製）がある。このようにして得られたcDNAを例えれば、プラスミドpUC118やファージ入gt11などのベクターにリガーゼを用いて挿入することによりcDNAライブラリーを作製する。次に、このようなcDNAライブラリーから、例えば、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するDNA断片をフローブとして用いるハイブリダイゼーション法や、配列番号2で示される塩基配列の部分塩基配列を有するオリゴスクレオチドをプライマーとして用いるPCR法により、本発明遺伝子を取得することができる。また、上記の如にして調製された全RNAを鉄型に使用して逆転写反応を行なった後、得られたDNAを鉄型にしてPCRを行なうことにより（RT-PCR法）本発明遺伝子を取得することもできる。上記のPCR法またはRT-PCR法においてPCRにより本発明遺伝子を増幅する際に用いるプライマーとしては、例えれば、20bpから40bp程度の長さでかつGまたはC塩基の割合が40%から70%程度の塩基配列を、配列番号2で示される塩基配列の5'末端領域および3'末端領域からそれぞれ選択し、該塩基配列を有するオリゴスクレオチドを合成するとよい。具体的には、例えれば、フォワードプライマーの塩基配列としては5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3'や5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3'があげられ、リバースプライマーの塩基配列としては5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3'があげられる。このようにしてPCRで増幅された本発明遺伝子は、例えれば、J.Sambrook, E.F.Frisch, T.Maniatis著；モレキュラークローニング第2版（Molecular Cloning 2nd edition）、コールドスプリングハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbor Laboratory）発行、1989年等に記載の遺伝子工学的方法に準じてベクターにクローニングすることができる。具体的には例えれば、TAクローニングキット（Invitrogen社）やpBluescriptII（Stratagene社）などの市販のプラスミドベクターを用いてクローニングすることができる。尚、本発明遺伝子は、配列番号2や配列番号4で示される塩基配列に基づいて、例えればホスファイト・トリエステル法（Hunkapiller, M. et al., Nature, 310, 105, 1984）等の通常の方法に準じて、核酸の化学合成を行うことにより調製することもできる。得られた本発明遺伝子の塩基配列は、Maxam-Gilbert法（例えれば、Maxam, A.M & W.Gilbert, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 71, 5

60, 1977 等に記載される）やSanger法（例えればSanger, F. & A.R.Coulson, J.Mol.Biol., 94, 441, 1975, Sanger, F. & Nicklen and A.R.Coulson., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 74, 5463, 1977等に記載される）に準じて解析することにより確認することができる。

【0005】このようにして取得される本発明遺伝子を、例えれば、宿主細胞内で複製可能なDNAであって、宿主細胞からの単離、精製が可能であり、検出可能なマークー遺伝子をもつベクターに、通常の遺伝子工学的手法を用いて組込むことにより本発明ベクターを構築することができる。本発明ベクターの構築に用いることができるベクターとしては、具体的には、微生物である大腸菌を宿主細胞とする場合、例えれば、プラスミドpUC119（宝酒造（株）製）や、ファージミドpBluescriptII（ストラタジーン社製）等をあげることができ、酵母を宿主細胞とする場合は、プラスミドpACT2（Clontech社製）などをあげることができる。また、哺乳類動物細胞を宿主細胞とする場合は、pRCE/RSV, pRC/CMV（Invitrogen社製）等のプラスミド、ウシハヒコマウイルスプラスミドpBPV（ファルマシア社製）、EBウイルスプラスミドpCEP4（Invitrogen社製）等のウイルス由来の自律複製起點を含むベクター、ワクシニアウイルス等のウイルスなどをあげることができ、昆虫類動物細胞（以下、昆虫細胞と記す）を宿主細胞とする場合は、バキュロウイルス等の昆虫ウイルスをあげることができる。バキュロウイルスやワクシニアウイルス等のウイルスに本発明遺伝子を組込むには、使用しようとするウイルスのゲノムと相同的な塩基配列を含有するトランスファーべクターを用いる。このようなトランスファーべクターの具体的例としては、Pharmingen社から市販されているpVL1392, pVL1393 (Smith, G.E., Summers, M.D. et al., Mol.Cell.Biol., 3:2156-2165, 1983)、pSFB(Funahashi, S. et al., J.Virol., 65:5584-5588, 1991)などのプラスミドをあげることができる。本発明遺伝子を前記のようなトランスファーべクターに挿入し、該トランスファーべクターとウイルスゲノムと同時に宿主細胞に導入すると、トランスファーべクターとウイルスゲノムとの間に相同組換えが起こり、本発明遺伝子がゲノム上に組み込まれたウイルスを得ることができる。ウイルスゲノムとしては、Baculovirus、Adenovirus、Vaccinia virusなどのゲノムを用いることができる。本発明遺伝子の上流に、宿主細胞で機能可能なプロモーターを機能可能な形で結合させ、これを上述のようなベクターに組み込むことにより、本発明遺伝子を宿主細胞で発現させることの可能な本発明ベクター（以下、本発明発現ベクターと記す）を構築することができる。ここで、「機能可能な形で結合させる」とは、本発明遺伝子が導入される宿主細胞においてプロモーターの制御下に発現するように、該プロモーターと本発明遺伝子とを結合させることを意味する。使用するプロモーターは、形質転換する宿主細胞内でプロモータ

一活性を示すものであれば特に制限はなく、例えば、宿主細胞が動物細胞や分裂酵母である場合は、例えば、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期もしくは後期プロモーター、マウス乳頭腫ウイルス (MMTV) プロモーター、単純ヘルペスウイルス (HSV) のチミシンキナーゼ (tk) 遺伝子プロモーター等をあげることができる。宿主細胞が出芽酵母である場合はADH1プロモーターなどをあげることができる。また、宿主細胞において機能するプロモーターをあらかじめ保有するベクターを使用する場合は、ベクター保有のプロモーターと本発明遺伝子とか機能可能な形で結合するように、該プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すればよい。例えば、前述のプラスミドpGCRSV,pGCMV等は、動物細胞で機能可能なプロモーターの下流にクローニング部位が設けられており、該クローニング部位に本発明遺伝子を挿入し動物細胞で導入すれば、本発明遺伝子が発現する。これらのプラスミドにはあらかじめSV40の自律複製起点 (ori) が組み込まれているため、ori(-)のSV40ゲノムで形質転換された培養細胞、例えばCHO細胞等に該プラスミドを導入すると、細胞内でプラスミドのコピー数が非常に増大し、結果として該プラスミドに組み込まれた本発明遺伝子を大量発現させることもできる。また、前述の酵母用プラスミドpATT24はADH1プロモーターを有しており、該プラスミドまたは他の誘導体のADH1プロモーターの下流に本発明遺伝子を挿入すれば、本発明遺伝子を例えればCG1945 (Clontech社製) 等の出芽酵母で大量発現させることが可能な本発明ベクターが構築できる。

【0006】上述のようにして構築された本発明ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明形質転換体を取得することができる。本発明ベクターを宿主細胞へ導入する方法は、形質転換される宿主細胞に応じて通常用いられる方法でよい。例えば、大腸菌を宿主細胞とする場合は、「モレキュラー・クローニング」(J.Sambrookら、コールド・スプリング・ハーバー、1989年) 等に記載される塩化カルシウム法やエレクトロポレーション法等を用いることができ、酵母を宿主細胞とする場合は、例えればリチウム法に基づくYeast transformation kit (Clontech社製)などを用いてベクターを導入することができる。また、哺乳類動物細胞や昆虫細胞等の動物細胞を宿主細胞とする場合は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、またはリボフェクション法等により該宿主細胞に本発明ベクターを導入することができる。尚、ウイルスをベクターに用いる場合は、上述のような一般的な遺伝子導入法によりウイルスゲノムを宿主細胞に導入できるほか、ウイルスゲノムを含有するウイルス粒子を宿主細胞へ感染させることによってもウイルスゲノムを宿主細胞に導入することができる。

【0007】本発明形質転換体の選抜は、導入された本発明ベクターが有する検出マークー遺伝子の性質に応じた方法を用いればよい。例えば、検出マークー遺伝子が、細胞致死活性を示す薬剤に対する耐性遺伝子である場合には、該薬剤を添加した培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。このようにして用いることのできる薬剤耐性遺伝子と選抜薬剤との組み合せとしては、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子とネオマイシンとの組合せ、ハイクロマイシン耐性遺伝子とハイグロマイシンとの組み合せ、プラスチサイジンS耐性遺伝子とプラスチサイジンSとの組合せ等をあげることができる。また、検出マークー遺伝子が、宿主細胞の栄養要求性を相補する遺伝子である場合には、該栄養素を含まない最少培地を用いて、本発明ベクターを導入した細胞を培養すればよい。さらに、本発明発現ベクターを導入した場合は、エストロジエン結合活性に基づく検出方法を用いることもできる。本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得するには、例えば、本発明ベクターを制限酵素等で消化することにより直鎖上にした後、これを前述の方法で宿主細胞へ導入して該細胞を通常数週間培養し、導入された本発明ベクターにコードされる検出マークーを指標にして目的とする形質転換体を選抜すればよい。例えば、上記のような選択薬剤に対する耐性遺伝子を検出マークー遺伝子として持つ本発明ベクターを前述の方法で宿主細胞に導入し、選択薬剤を添加した培地で数週間以上該細胞を継代培養して、コロニー状に生き残った選択薬剤耐性クローニングをビペットで吸い上げ純化することにより、本発明遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる本発明形質転換体を取得することができる。該形質転換体は、凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができるので、一過性の遺伝子導入株と比較して、形質転換体作製の手間を省くことができ、形質転換体の性能を一定に保つことができる。

【0008】上述のようにして得られた本発明形質転換体を培養することにより本発明のエストロジエンレセプターを產生させることができ。例えば、本発明形質転換体が微生物である場合、該形質転換体は、一般微生物における通常の培養に使用される炭素源や窒素源、有機ないし無機塩等を適宜含む各種の培地を用いて培養すればよい。培養は、一般微生物における通常の方法に準じて行い、固体培養、液体培養（試験管振とう式培養、往復式振とう培養、ジャーファーメンター (Jar Fermenter) 培養、タンク培養等）等が可能である。培養温度は、微生物が生育する範囲で適宜変更でき。例えば、約15°C～約40°Cの培養温度、約pH～約8の培地pHで培養するとよい。培養時間は、種々の培養条件によって異なるが、通常約1～約5日間である。また、上記形質転換体が動物細胞である場合、一般の培養細胞における通常の培養に使用される培地を用いて培養すればよい。選

抗薬剤を利用して当該形質転換体を選択した場合は、対応する選択薬剤を共存させて培養するのが望ましい。哺乳類動物細胞の場合、例えば10v/v%となるようFBSを添加したDMEM培地等の培地を用いて、37°C、5v/v%CO₂存在下等にて、培地を数日ごとに交換しながら培養する。細胞がコンフルエントになるまで増殖したら、0.25w/v%程度のトリプシンPBS溶液を用いて個々の細胞に分散させ、数倍に希釈して新しい培養容器に播種し培養を続ける。目的とする量まで細胞が増殖したら細胞を集め。昆虫細胞の場合も同様に、10v/v%FBSおよび2w/v%Yeast tateを含むGrace's medium等の昆虫細胞用培地を用いて25°Cから35°Cで継代培養する。ただし、Sf 21細胞などの培養容器からはがれやすい細胞の場合は、トリプシン液ではなくヒベッティングにより細胞を分散させ継代を行なう。また、Baculovirus等のウイルスベクターを含む形質転換体の場合は、細胞質効果により細胞が死滅する前、例えば培養開始から72時間目までに培養を終了することが好ましい。本発明形質転換体により產生されたエストロジエンレセプターの回収は、適宜、通常の単離、精製の方法を組み合わせて行なえ良く、例えば、培養終了後、形質転換体の細胞を遠心分離等で集め、該細胞を通常のバッファー、例えば、20mMHEPES pH7.1mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSFからなるバッファー等に懸濁した後、ボリトロン、超音波、ダウンスホモジナイザー等を用いて細胞を破碎し、破碎液を数万×gで数十分から1時間程度超遠心分離し、上清画分を回収することにより、エストロジエンレセプターを含む画分を得ることができる。さらに、前記上清画分をイオン交換、疎水、ゲルろ過、アフィニティ等の各種クロマトグラフィーに供することにより、より精製されたエストロジエンレセプターを回収することもできる。この際、後述のエストロジエンレセプターが結合する塩基配列を含む1.5kbから2.0kb程度の長さのオリゴスクレオチドをフローブとしたDNA結合アッセイなどにより、目的とするエストロジエンレセプターを含む画分を見分けることができる。このようにして製造された本発明のエストロジエンレセプターは、例えば、エストロジエンレセプターに対する化学物質の親和性を測定するためのラジオレセプターアッセイ等に用いることができる。

【0009】上述のようにして構築された本発明発現ベクターは、例えば、化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価するためのレポーター・アッセイに利用することができる。具体的には、エストロジエン応答配列を有しエストロジエンレセプターにより転写が制御される遺伝子、例えばビテロジエン遺伝子の転写制御領域の下流にレポーター遺伝子を結合させたキメラ遺伝子、または、エストロジエン応答配列の下流に転写開始に必要な塩基配列とレポーター遺伝子とを結合させたキメラ遺伝子（以下、本キメラ遺伝子と記す。）を、細胞内でのエストロジエンレセプターの転写調節能をモニタ

ーするためのレポーター遺伝子として用いる。エストロジエン応答配列（estrogen response element）とは、エストロジエンにより転写が制御される遺伝子のプロモーターの上流に存在し、エストロジエンレセプターによって認識される塩基配列を意味する。エストロジエンの結合したエストロジエンレセプターは活性化されてエストロジエン応答配列に結合することにより、該配列の下流にある遺伝子の転写を促進する。エストロジエン応答配列のコンセンサス配列としては、塩基配列 AGTCANNN TGACCT（Nは、A、G、C、またはTを意味する。）が一般に知られている。レポーター遺伝子としては、ルシフェラーゼ遺伝子、分泌型アルカリファーストアーゼ遺伝子、βガラクトシダーゼ遺伝子、クリラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、成長ホルモン遺伝子などが利用できる。上述のように作製した本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子を組み込んだベクターとを、内在性のエストロジエンレセプターを産生していない宿主細胞、例えばHeLa細胞やNIH3T3細胞などに導入し形質転換体を取得する。この形質転換体をそのまま1日から数日間培養する間に、例えばエストロジエン様作用をもつ化学物質を培地中に加えて前記形質転換体に作用させる。該形質転換体が产生するエストロジエンレセプターが化学物質の結合により活性化された場合は、レポーター遺伝子のmRNAの転写が促進され、ルシフェラーゼ酵素蛋白質が形質転換体の細胞内に蓄積する。この状態の形質転換体を破碎して細胞粗抽出物を調製し、レポーターの酵素活性を指標にして細胞当たりのレポーター蛋白質の量を求める。例えば、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合、前記細胞粗抽出物にルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを加えると発光し、発光量はルシフェラーゼ量に比例する。従って、この発光量をルミノメーター等の測定装置で測定することにより、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量がわかり、よって、その際に添加されていた化学物質のエストロジエンレセプター活性化能を評価することができる。また、本発明発現ベクターと、本キメラ遺伝子が組み込まれたベクターとを同時に宿主細胞に導入して、本発明遺伝子および本キメラ遺伝子が宿主細胞の染色体に導入されてなる形質転換体を取得し、上記レポーター・アッセイに用いてもよい。該形質転換体は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することができる。これを一旦取得すると、アッセイの度ごとにこれらの遺伝子を宿主細胞に導入して新たな形質転換体を取得する必要が無く、また、形質転換体の性能を一定に保つこともできることから、例えばハイスクロットスクリーニング等の自動化された大規模スクリーニングを実施する際に有用である。

【0010】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例によって限定されるもの

ではない。

【0011】実施例1（本発明遺伝子の取得）

鯛（コイ稚魚用）にβ-エストラジオール（和光純薬工業株式会社製）10mg/1を10mg/g鯛となるように添加し、これにアセトンを加えてよく混和した後、ペアードライヤーの下でアセトンを除去した。こうして得た処理鯛を、約3ヶ月のヒメダカ雄10個体に3回一日の頻度で1日間飽食量を与えた。β-エストラジオール投与24時間後に、これらのヒメダカから内臓を摘出し、直ちに組織1

XU1 : 5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3' (22mer, GC/AT = 13/9)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター) にサブクローニングして大腸菌DH5 α に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー(XU1, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ERにクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号2で示される塩基配列が明らか

XU36 : 5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3' (25mer, GC/AT = 11/14)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

次いで、前記RT-PCRで得られたDNA断片をpCR2.1 (TA cloningベクター) にサブクローニングして大腸菌DH5 α に導入し、プラスミドを調製した(pCR-ER2)。pCR2.1の塩基配列に基づくプライマーおよび上記のプライマー(XU36, XU14)を用い、ABI sequence systemで、前記のpCR-ER2にクローニングされたDNA断片の塩基配列を決定した。その結果、配列番号1で示される塩基配列が明らかとなった。

【0012】実施例2（本発明遺伝子発現用ベクターの構築）

実施例1で得られたプラスミドpCR-ERからエストロジエンレセプター遺伝子をXba I とHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRE/RSVに組み込み、エストロジエンレセプターを発現させるための発現ベクターRSV-ER2を構築した。

オリゴスクレオチド1:

5'-CCA AAG TCA GGT CAC AGT GAC CTG ATC AAA GGA AC-3'

オリゴスクレオチド2:

5'-CTT TGA TCA GGT CAC TGT GAC CTG ACT TTG GGT TC-3'

両オリゴスクレオチドの末端をカイネーションによりリン酸化した。カイネーション反応液は、10 nmolのオリゴスクレオチド1または10 nmolのオリゴメクレオチド、2.5 μ lの10 X カイネーションバッファー、1 μ lの10 mMのATP、2.5 μ lのポリメクレオチドキナーゼ（宝酒造社製）を1.5 ml容チューブに採り、滅菌蒸留水を加え全量を50 μ lとして調製した。カイネーション反応は37°Cで1時間行った。反応終了後、リン酸化したオリゴスクレオチド1とオリゴメクレオチド2をアニーリングさせ、2本鎖のEREを得た。アニーリング反応液は、リン酸化させたオリゴスクレオチド1およびオリゴメクレオチド2のそれぞれ20 μ lずつを、1.5 ml容チュ

gあたり10mlのトリゾール試薬を加えてホモジナイズした後、クロロホルムを加えて遠心分離した。水相を採取してイソプロパノールを加えRNAを沈澱させた。約0.3g 約500 μ gのRNAが得られた。このようにして調製したRNA 1 μ gを錆型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30°Cで10分間逆転写反応を行い、引き続き42°Cで50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー（XU1とXU14）を用いPCR（30サイクル、94°C 30sec-1min、50-60°C 1-1.5min、72°C 1-3min）を行った。

XU1 : 5'-ATG TAC CCT GAA GAG AGC CGG G-3' (22mer, GC/AT = 13/9)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

となつた。また、上記のようにして調製したRNA1 μ gを錆型とし、ランダム9merプライマーを用い、予め30°Cで10分間逆転写反応を行い、引き続き42°Cで50分間逆転写反応を行った。続いて下記のプライマー（XU36とXU14）を用いPCR（30サイクル、94°C 30sec-1min、50-60°C 1-1.5min、72°C 1-3min）を行つた。

XU36 : 5'-AAG CTT CAT GAG TAA GAG ACA GAG C-3' (25mer, GC/AT = 11/14)

XU14 : 5'-TCA GTC TTG AAG GGC CGG GGA G-3' (22mer, GC/AT = 14/8)

ベクターRSV-ERを構築した。具体的な過程を図1に、発現ベクターRSV-ERの構造の詳細を図2示す。また、同様にして、実施例1で得られたプラスミドpCR-ER2からエストロジエンレセプター遺伝子をXba I とHind IIIで切り出し、同じ制限酵素で消化した発現ベクターpRE/RSVに組み込み、エストロジエンレセプターを発現させるための発現ベクターRSV-ER2を構築した。

【0013】実施例3（エストロジエンレセプターに応答するレポーター遺伝子を有するベクターの構築）

既知のセノフスのA2ビテロジエン遺伝子（GenBank Accession No. M00205）のうち末端領域のエストロジエン応答配列（以下、EREと記す）のコンセンサス配列とともに、下記のオリゴスクレオチド1およびオリゴスクレオチド2を合成した。

オリゴスクレオチド1:

5'-CCA AAG TCA GGT CAC AGT GAC CTG ATC AAA GGA AC-3'

オリゴスクレオチド2:

5'-CTT TGA TCA GGT CAC TGT GAC CTG ACT TTG GGT TC-3'

一液に加え、95°Cで5分間保温し、60°C、次いで37°Cにてそれぞれ1時間保温した後、室温で約1時間放置した。反応終了後、10 μ lのアニーリング反応液に10 μ lのDNAリガーゼ（ライゲーションキット、宝酒造社製）を加え、2本鎖のERE断片を連結した。反応液をアガロースゲル電気泳動に供してDNA断片の長さを分析し、ERE断片が4個連結されたと判断されるDNA断片（以下、4 X ERE断片と記す。）およびERE断片が5個連結されたと判断されるDNA断片（以下、5 X ERE断片と記す。）をそれぞれ回収した。これらのDNA断片をブランディングキット（宝酒造社製）を用い、末端を平滑化した。一方、pBluescript (SK-) を制限酵素EcoR I（宝酒

造社製)で切断し、5'末端をアルカリフィオスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。前記のDNA断片(4 X ERE断片または5 X ERE断片)とpBluescript(SK-)とをそれぞれDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 α のコンビテントセル(東洋紡社製)を形質転換してアンピシリン耐性となつた株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、塩基配列を ABI PRISMTM 377 DNA Sequence System(パーキンエルマージャパン社製)で確認した。次に、HSV-TKプロモーター配列を持つベクターpTK β (クロントック)を制限酵素Sal IおよびXba I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断した後アガロースゲル電気泳動で分析し、約1 kbpのTKプロモーター断片を得た。該断片をプランティングキットを用い、末端を平滑化した。一方、ルシフェラーゼ遺伝子を持つレポータープラスミドpGL-3(ビッカジーン)を制限酵素Sma I(宝酒造社製)で切断し、5'末端をアルカリフィオスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。2つのDNA断片をDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 α のコンビテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となつた株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、TKプロモーター挿入したレポータープラスミド(TK-pGL-3)を取得した。次に、上記の4 X ERE断片が挿入されたpBluescriptを制限酵素Kpn IおよびXba I(それぞれ宝酒造社とニッポンジーン社製)で切断し、アガロースゲル電気泳動で4 X ERE断片を回収した。一方、TK-pGL-3をKpn IおよびNhe I(いずれも宝酒造社製)で消化し、5'末端をアルカリフィオスフェターゼ(宝酒造社製)で脱リン酸化した。このようにして調製された4 X ERE断片とTK-pGL-3とをDNAライゲーションキットを用いて結合した。得られた反応液で大腸菌DH5 α 株のコンビテントセル(東洋紡)を形質転換してアンピシリン耐性となつた株を選抜し、該アンピシリン耐性株からプラスミドDNAを調製し、4 X ERE断片およびTKプロモーター断片を保存するレポータープラスミド(ERE-TK-pGL)を取得した。該プラスミドの構築の過程を図3に、該プラスミドの構造を図4に示す。また、同様にして、上記の5 X ERE断片が挿入されたpBluescriptから5 X ERE断片を回収し、該断片と、Kpn IおよびNhe Iで消化されたTK-pGL-3とを結合させ、5 X ERE断片およびTKプロモーター断片を保存するレポータープラスミド(ERE5-TK-pGL)を取得した。

【0011】実施例1(プラスミドDNAの大量調製)

実施例2で得られた発現ベクターRSV-ER、レポータープラスミドERE-TK-pGLおよびERE5-TK-pGL、ならびにコントロールレポータープラスミドであるpRL-TK(ビッカジーン)のDNAを以下の方法により大量に調製した。上記プラスミドを含む大腸菌をアンピシリン(終濃度50 μ g/ml)を含有LB培地3mlに植菌し、37°Cで一晩振動培養した。そ

の培養液をアンピシリン(50 μ g/ml)を含むLB培地200mlに植菌し、一晩振動培養した。一晩培養後の菌体を5,000 rpm、10分間、4°Cで遠心分離し(CR21、日立工機)、得られた沈殿を0.1 MのSTEバッファー60 mlに懸濁し、同条件で再度遠心分離した。沈殿を3 mlのsolution 1に懸濁し、1 mlのリゾチーム(20 mg/ml)を加え、室温で5分間放置した。引き続き10 mlのsolution 2を加え、氷上に10分間放置した後、7.5 mlのsolution 3を加え、氷上に15分間放置した。12,000 rpm、20分、4°Cで遠心分離し、上清を50 mlチューブに移し、0.6容量のイソプロピルアルコールを加え、室温で15分間放置した。3,000 rpm、10分間、室温で遠心分離し(CR5DL、日立工機)、70%エタノールで洗浄し、乾燥させた。沈殿を4.2 mlのTEバッファーに溶かし、5 mg/ml RNase溶液(ニッポンジーン)を28 μ l加え、50°C、30分間インキュベートした。2 mg/mlエチシウムプロマイド溶液400 μ lとCsCl(関東化学)4.6 gを加えた後、日立工機シールチューブに移し、55,000 rpm、20°C、16時間遠心分離(SCPS5H2、日立工機)した。スーパーコイルプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、55,000 rpm、20°C、16時間再度遠心分離した。再びスーパーコイルプラスミドDNAのバンドを注射筒で抜き取り、水飽和イソアミルアルコールでエチジウムプロマイドを完全に除き、一晩5 mM STEバッファーに透析した後、試料として用いた。

【0015】実施例5(細胞の培養)

不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)を活性炭一デキストランで処理し、細胞培養の培地作製に用いた。処理過程における各ステップは以下の通りであった。25 Mスクロース(和光純薬)、1.5 mM MgCl₂(和光純薬)、10 mM HEPES(pH7.4)(同仁化学、熊本)1L中にノーリットEXW(ナカライトスク)2.5gとテキストランT-70(ファルマシアバイオテク、スウェーデン)0.25gを懸濁し、4°Cで終夜攪拌した。本懸濁液を12,000 rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させた。これを不活化済み牛胎仔血清(GIBCO-BRL、米国)1Lに懸濁し、4°Cで終夜攪拌した。その後、12,000 rpmで10分遠心(CR21、日立工機)して活性炭を沈殿させ、取り除いた。以上の操作を2回繰り返した後、ザルトラPAV500(0.20 μ m、ザルトリウス、独国)を用いてフィルターろ過したら液を活性炭一デキストラン処理済みの牛胎仔血清とした。ヒト子宮癌細胞株HeLa(大日本製薬)を、10%活性炭一デキストラン処理済みの牛胎仔血清、0.03% L-グルタミン(日本製薬)および0.15%炭酸水素ナトリウムを添加したイーグルMEM(日本製薬)培地を用いて10 cmの組織培養用ディッシュ(ファルコン)に培養した。細胞の離代・播種は培地を除去後、適量のPBS(-)(日本製薬)で接着した細胞を洗浄し、PBS(-)80 mlに5%トリプシン(DIFCO、米国)10 ml、0.2%EDTA・3 Na(同仁化学)10 mlを添加した液を用いて細胞を剥離した。細胞の培養はすべて5% CO₂および飽和湿度下、37°C

で(1) インキュベータ(アステック)内で培養した。

【0016】実施例6（レポーター・アッセイ）

以下の操作を各条件ごとに1-4連で実験を行った。実施例5で培養した細胞の培地を除去し、PBS(-)で1回洗浄した。5%トリプシン(DIFCO, 米国)5 mlを加え、細胞を剥離した。細胞の計数した後24ウェルマルチウェルプレート(ファルコン)に播種した。細胞を1ウェルあたり40,000個のHeLa細胞を播種した。1ウェルあたり0.5mlの10%活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清含有培地を添加し翌日まで培養した。トランスフェクションは1ウェルあたり0.25~1.0 μ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.1~0.5 μ gのレポータープラスマドERE-tk-pGLまたはERE5-tk-pGL、および、0.05~0.1 μ gのコントロールレポータープラスマドpRL-tkを、0.35ml/ウェルのリボフェクチン(GIBCO-BRL)またはリボフェクタミン(GIBCO-BRL)を用いて、無血清培地中にて細胞に導入した。1ウェルあたりの培地量は200 μ lとした。導入方法は添付説明書に従った。各細胞をトランスフェクション培地中で5時間培養後に10%活性炭-デキストラン処理済みの牛胎仔血清含有培地に交換し、翌日まで培養を続けた。次いで、 β -エストラジオール(和光純薬社製)をDMSO(関東化学)に溶解しイーグルMEM培地に溶かして、上述の細胞に添加した。 β -エストラジオール終濃度は10 pMから100 nMの範囲とした。 β -エストラジオール添加後の1ウェルあたりの培地量は1 mlとした。 β -エストラジオールを添加してから約28時間培養後、培地を除去し、 β -エストラジオールに曝露した細胞をPBS(-)で2回洗浄した。ヒッカジーンデュアルキット(東洋インキ)中の細胞溶解剤を超純水で5倍希釈したものと1ウェルあたり50 μ l添加し、室温で30分間放置して細胞を溶解した。方法はキットの添付説明書に従った。細胞溶解液1.0 mlを白色96ウェルマルチウェルプレート(発光測定用、ベルトールド、ドイツ)に移し、キット中の発光基質2種(ルシフェリン、セランテラジン)を順次添加し、それぞれの発光量をルミノメーター(ベルトールド、LBR96P)で測定した。はじめに添加する発光基質はレポータープラスマドERE-tk-pGL由来のホタルルシフェラーゼによる発光を測定するために用い、後で添加する発光基質はコントロールレポータープラスマドpRL-tk由来のシーバンジールンフェラーゼによる発光を測定するために用いた。前者の発光量は化学物質が遺伝子の転写活性にあたえる影響を反映している。また、後者の発光量は内部標準として個々の実験データを補正するために用いる。

【0017】実施例7（トランスペクション条件の検討）

実施例6記載のレポーターAセイにおいて、トランスフェクションの際の各ウェルへのプラスミドの添加量と、リボフェクチンまたはリボフェクタミンの添加量について検討した。まず、各ウェルに、プラスミド(*tk-p*

(GL-3)を0.2μgから1.2μg、リボフェクチンまたはリボフェクタミンを0.2μlから0.8μlの範囲で添加してトランسفエクションを行い、得られた細胞を培養して、実施例6記載の方法に準じてルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図4に示した。リボフェクチンを用いた場合には、リボフェクチン0.4μlとプラスミド0.4μgを加えたときに、リボフェクタミンを用いた場合は、リボフェクタミンを0.6μlとプラスミド0.4μg加えたときに、それぞれ最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。次に、リボフェクチンまたはリボフェクタミン添加量について更に詳細に検討した。すなわち、各ウェルに加えるプラスミド量(0.4μg)を固定し、リボフェクチンはウェル当り0.3~0.55μlの範囲で、リボフェクタミンはウェル当り0.4~0.9μlの範囲で添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果を図6に示した。リボフェクチンを0.35μl加えた場合、または、リボフェクタミンを0.6μl加えた場合にそれぞれ最も高いルシフェラーゼ活性を認めた。この結果を基に、リボフェクチンとリボフェクタミンの添加量をそれぞれ0.35μlと0.6μlに固定して、再度プラスミドの添加量を詳細に検討した。その結果を図7に示した。プラスミドを0.4~0.6μgを加えた場合に最も高いルシフェラーゼ活性が認められた。以上の結果を基に、レホーター・アッセイにおける各ウェルに添加する最適なプラスミドの量を0.4μg~0.6μg、リボフェクチンの量を0.35μl、リボフェクタミンの量を0.6μlと決定した。

【0018】実施例S (β -エストラジオールによる反応性の確認)

実施例6記載の方法および実施例7で得られた最適条件下に、HeLa細胞におけるβ-エストラジオール(E₁)のエストロジエンレセプター活性化能を測定した。ウエル内のβ-エストラジオールの終濃度が10pMから50nMとなる条件でルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図8と9に示した。100pM以上でルシフェラーゼ活性の上昇を認め、1nMでの活性は最大に達した。β-エストラジオール50nMでは活性の低下が認められたがこれは細胞毒性によるものであると思われた。

【0019】実施例9（化学物質のエトシジョン様作用の測定）

実施例6の方法および実施例7の結果で得られた最適条件下に、HeLa細胞におけるビスフェノールA、p-ノニルフェノール、酢酸トリプチルすず、またはフタル酸ジ- γ -エチルヘキシルのエストロジエンレセプター活性化能を測定した。アッセイにおける各被験化学物質の終濃度は10 pMから50 nMの範囲として実験を行った。各被験化学物質の溶解性を光学顕微鏡下、沈殿物あるいは浮遊物がないことを目視で確認した。また、被験化合物に替えて β -エストラジオールを終濃度500 pMとなるように添加した群を設定し、陽性対照とした。ビスフェノールAまたはノニルフェノールでは100 nMで活性が上昇し

始め、 $10\mu M$ では活性化倍率は溶媒コントロール（DMSOのみ添加）の約2倍に上昇した（図10、11）。酢酸トリプチルすずまたはタル酸ジーエチルヘキシルでは活性の上昇は認められなかった（図12、13）。さらに上記4種について $50\mu M$ での実験も行った。その結果を図14に示した。ビスフェノールAで更なる活性の上昇を認めた。ノニルフェノールにおいては細胞に対する毒性に起因すると思われる活性の低下が認められた。

<:110>; Sumitomo Chemical Company Limited

<:120>; Estrogen receptor genes

<:130>; P150237

<:150>; JP 10/319465

<:151>; 1998-11-10

<:160>; 4

<:210>; 1

<:211>; 575

<:212>; PBT

<:213>; Oryzias latipes

<:100>; 1

Met	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ser	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Val	Asp
1															
Leu	Leu	Glu	Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Ala	Pro	Asn	Pro	Ala	Thr	Thr
Pro	Leu	Tyr	Ser	Gln	Ser	Ser	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu
Thr	Asn	Gly	Pro	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Gly	Ser	Gly
Pro	Thr	Ser	Pro	Leu	Val	Phe	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Ser	Pro
Phe	Met	His	Pro	Pro	Ser	His	His	Tyr	Leu	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro
Val	Tyr	Arg	Ser	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Ser	Arg	Glu	Asp	Gln	Cys	Gly
Ser	Arg	Glu	Asp	Thr	Cys	Ser	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly
Ala	Gly	Gly	Phe	Glu	Met	Ala	Lys	Asp	Thr	Arg	Phe	Cys	Ala	Val	Cys
130	135	140	145	150	155	160	165	170	175	180	185	190			
Ser	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gly	Tyr	His	Tyr	Gly	Val	Trp	Ser	Cys	Glu	Gly
Cys	Lys	Ala	Phe	Phe	Lys	Arg	Ser	Le	Gln	Gly	His	Asn	Asp	Tyr	Met
Cys	Pro	Ala	Thr	Asn	Gln	Cys	Thr	Le	Asp	Arg	Asn	Arg	Arg	Lys	Gly

【0020】参考例1（他の細胞用いたアッセイ）

他の種類の培養細胞を選び、実施例9～9と同様の実験を行う。

【0021】

【発明の効果】メダカエストロジェンレセプターをコードする遺伝子、および、化学物質の該レセプター活性化能を評価するための試験系等が提供可能となる。

【0022】

【配列表】

Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys
 195 200 205
 Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg
 210 215 220
 Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His
 225 230 235 240
 Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly
 245 250 255
 Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu
 260 265 270
 Gln Val Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser
 275 280 285
 Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu
 290 295 300
 Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala
 305 310 315 320
 Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu
 325 330 335
 Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp
 340 345 350
 Arg Ser Ile Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile
 355 360 365
 Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe
 370 375 380
 Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys
 385 390 395 400
 Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly
 405 410 415
 Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu Ile Asn Ser Ala
 420 425 430
 Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr
 435 440 445
 Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala
 450 455 460
 Gln Pro Leu Leu Leu Ser Ile Arg Ile Arg Met Ser Asn Lys Gly
 465 470 475 480
 Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr
 485 490 495
 Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu Ile His Pro Val
 500 505 510
 Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr
 515 520 525
 Ser Ser Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg
 530 535 540
 Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu
 545 550 555 560
 Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp
 565 570 575

<211>: 1728

<212>: DNA

<213>: Oryzias latipes

<220>;

<221>; CDS

<222>; (1)...(1728)

<400>; 2

atg tac cct gaa gag age egg ggt tct gga ggg gts get get gtg gac	48
Met Tyr Pro Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp	
1 5 10 15	

ctt ttt gaa ggg aeg tac gac tat gce gec ccc aac cct gcc aeg act	96
Leu Leu Glu Glu Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr	
20 25 30	

ccc ctt tac age eag tcc age acc ggc tac tac tet get ccc ctg gaa	144
Pro Leu Tyr Ser Gln Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu	
35 40 45	

aca aac gga ccc ccc tca gaa ggc agt ctg cag tcc ctg ggc agt ggg	192
Thr Asn Gly Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly	
50 55 60	

cgg aeg age cct ctg gtg ttt gtg ccc tcc age ccc aga ctc agt ccc	240
Pro Thr Ser Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro	
65 70 75 80	

ttt atg cat cca ccc age eac eac tat ctg gaa acc act tcc aeg ccc	288
Phe Met His Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro	
85 90 95	

gtt tac aga tcc age eac eac ggc gec tcc agg gag gac eac tgc ggc	336
Val Tyr Arg Ser Ser His Gln Glu Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly	
100 105 110	

tcc cgg gag gac aeg tgc age ctg ggg gag tta ggc gec gga gec ggg	384
Ser Arg Glu Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Glu Ala Gly Ala Gly	
115 120 125	

gtt ggg ggg ttt gag atg gec aaa gac aeg cgt ttc tgc gec glg tgc	432
Ala Gly Gly Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys	
130 135 140	

age gac tac gec tet ggg tac eac tat ggg gtg tgg tet tgt gag ggc	480
Ser Asp Tyr Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly	
145 150 155 160	

tgc aag gec ttc ttc aag agg age atc eac ggc ggt eac aat gac tat atg	528
Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met	
165 170 175	

tcg cca cgg aac aat eac tgc act att gac aga aat ega agg aag ggc	576
Cys Pro Ala Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly	
180 185 190	

tgt cag get tgt cgt ctt agg aag tgc tac gaa gtg gga atg atg aaa	624
Cys Gln Ala Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys	
195 200 205	

ggc ggt gtg cgc aag gac egc att egc att tta egg cgt gac aaa egg	672
Gly Gly Val Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg	

210	215	220	720
egg aca ggc gtt ggt gat gga gac aag gtt gta aag ggt cag gag cat			
Arg Thr Gly Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His			
225	230	235	240
aaa acg gtg cat tat gat gga agg aaa cgc aca gac aca gca gga gga gga			768
Lys Thr Val His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly			
245	250	255	
gga gga gga gga gga aga ctg tct gtg acc aca ata ctc ctc gag			
Gly Gly Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu			
260	265	270	816
cag gtg ctg ctc ctc ctt cag ggc gec gag ccc ccc ata ctc tgc tcc			
Gln Val Leu Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser			
275	280	285	864
cgt cag aag ttg aca cgg tac acc gag gtc acc atg atg acc ctg			
Arg Gln Lys Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu			
290	295	300	912
ctc acc aca atg gca gac aag gag ctg gtc cac atg atc gec tgg gec			
Leu Thr Ser Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala			
305	310	315	320
aag aag ctc cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg cac gat cag gtg ctg			1008
Lys Lys Leu Pro Gly Phe Leu Glu Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu			
325	330	335	
ctg ctg gag aca tgg tgg ctg gag gtc ctc atg atc ggc ctc att tgg			
Leu Leu Glu Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp			
340	345	350	1056
agg tcc atc cac tgt ccc ggg aag ctc atc ttt gca caa gac ctc atc			
Arg Ser Ile His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile			
355	360	365	1104
ctg gac agg aat gag gga gac tgc gtg gaa ggc atg aca gag atc ttc			
Leu Asp Arg Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe			
370	375	380	1152
gac atg ctg ctg gcc act get tcc ege ttc cgt gtg ctc aaa ctc aaa			
Asp Met Leu Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys			
385	390	395	400
cct gag gaa ttc gtc tgc ctc aaa get att att tta ctc aac tcc ggt			1248
Pro Glu Glu Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly			
405	410	415	
gtt ttt tet ttc tgc acc ggc acc atg gag cca ctt cac aac aca ggc			
Ala Phe Ser Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala			
420	425	430	1296
ggc gtt cag aca atg ctg gac acc atc aca gac gca ctc att cat tac			
Ala Val Gln Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr			
435	440	445	
atc aca cgt tgg ggt tac ttg gca cag gag cag ggg aca cgg cag gec			
Ile Ser Gln Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala			
450	455	460	1392
cag ccc ctc ctg ctg ctc tcc cac atc agg cac atg aca aac aaa ggc			
Gln Pro Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly			
465	470	475	1440
atg gag ccc ctc tac aca atg aag tgc aac aac aaa gtc ccc ctt tat			
1488			

Met Glu His Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr
 485 490 495
 gac ctc cta ctg gag atg ctc gat gcc cac cgc ctg cac cac ccc gtc
 Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val
 500 505 510
 aga gcc ccc cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac cct ccc tcc acc
 Arg Ala Pro Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr
 515 520 525
 agc aca ggc ggg ggt gga atc gtc get ccc ggt tct ata tca gca tct cga
 Ser Ser Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg
 530 535 540
 ggc aca atc gag agt ccc aga ggc ccc ttt get ccc agt gtc ctt
 Gly Arg Ile Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu
 545 550 555 560
 cag tat gga ggg tcc cgt ect gac tcc acc ccc gcc ctt caa gac tga
 Gln Tyr Gly Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp
 565 570 575

<:210>; 3

<:211>; 620

<:212>; PRT

<:213>; Dryzias lapites

<:400>; 1

Met Ser Lys Arg Gln Ser Ser Val Gln Ile Arg Gln Leu Phe Gly Pro
 1 5 10 15
 Ala Leu Arg Ser Arg Ile Ser Pro Ala Ser Ser Glu Leu Glu Thr Leu
 20 25 30
 Ser Pro Pro Arg Leu Ser Pro Arg Asp Pro Leu Gly Asp Met Tyr Pro
 35 40 45
 Glu Glu Ser Arg Gly Ser Gly Gly Val Ala Ala Val Asp Leu Leu Glu
 50 55 60
 Gly Thr Tyr Asp Tyr Ala Ala Pro Asn Pro Ala Thr Thr Pro Leu Tyr
 65 70 75 80
 Ser Glu Ser Ser Thr Gly Tyr Tyr Ser Ala Pro Leu Glu Thr Asn Gly
 85 90 95
 Pro Pro Ser Glu Gly Ser Leu Gln Ser Leu Gly Ser Gly Pro Thr Ser
 100 105 110
 Pro Leu Val Phe Val Pro Ser Ser Pro Arg Leu Ser Pro Phe Met His
 115 120 125
 Pro Pro Ser His His Tyr Leu Glu Thr Thr Ser Thr Pro Val Tyr Arg
 130 135 140
 Ser Ser His Gln Gly Ala Ser Arg Glu Asp Gln Cys Gly Ser Arg Glu
 145 150 155 160
 Asp Thr Cys Ser Leu Gly Glu Leu Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly
 165 170 175
 Phe Glu Met Ala Lys Asp Thr Arg Phe Cys Ala Val Cys Ser Asp Tyr
 180 185 190
 Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala
 195 200 205

Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala
 210 215 220
 Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala
 225 230 235 240
 Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val
 245 250 255
 Arg Lys Asp Arg Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly
 260 265 270
 Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val
 275 280 285
 His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu
 305 310 315 320
 Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys
 325 330 335
 Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser
 340 345 350
 Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu
 355 360 365
 Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu
 370 375 380
 Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile
 385 390 395 400
 His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg
 405 410 415
 Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu
 420 425 430
 Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu
 435 440 445
 Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser
 450 455 460
 Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu His Asn Ser Ala Ala Val Gln
 465 470 475 480
 Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln
 485 490 495
 Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Gln Ala Gln Pro Leu
 500 505 510
 Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His
 515 520 525
 Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu
 530 535 540
 Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His His Pro Val Arg Ala Pro
 545 550 555 560
 Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly
 565 570 575
 Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile
 580 585 590
 Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly
 595 600 605

Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp
 610 615

<:210>; 2
<:211>; 1863
<:212>; DNA
<:213>; Oryzias latipes

<:220>;
<:221>; CDS
<:222>; (1)...(1863)

<:100>; 2

atg	agt	aag	aga	cag	age	tgc	cag	atc	agg	cag	ctg	ttc	gga	cca		48	
Met	Ser	Lys	Arg	Gln	Ser	Ser	Val	Gln	Ile	Arg	Gln	Leu	Phe	Gly	Pro		
1									10						15		
gea	ctc	aga	tcc	agg	atc	age	cca	gcc	tcc	tca	gag	ctg	gag	acc	ctc		96
Ala	Leu	Arg	Ser	Arg	Ile	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Glu	Leu	Glu	Thr	Leu		
20									25						30		
tcc	cca	cct	cgc	cgc	cgc	tgc	ccc	cgt	gac	atg	tac	cct				144	
Ser	Pro	Pro	Arg	Leu	Ser	Pro	Arg	Asp	Pro	Leu	Gly	Asp	Met	Tyr	Pro		
35									40						45		
gaa	gag	agc	egg	ggg	tct	gga	ggg	gtg	gtc	gtc	gtg	gac	ctt	ttg	gaa		192
Glu	Glu	Ser	Arg	Gly	Ser	Gly	Gly	Val	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Glu		
50									55						60		
ggg	aeg	tac	gac	tat	gct	gcc	ccc	aac	cct	gct	acg	act	ccc	ctt	tac		240
Gly	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Ala	Pro	Asn	Pro	Ala	Thr	Thr	Pro	Leu	Tyr		
65									70						75		
age	cag	tcc	age	acc	ggc	tac	tac	tet	gtc	ccc	ctg	gaa	aca	aac	gga		288
Ser	Gln	Ser	Ser	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Ala	Pro	Leu	Glu	Thr	Asn	Gly		
85									90						95		
ccc	ccc	tca	gaa	ggc	agt	tgc	cag	tcc	ctg	ggc	agt	ggg	cgg	aeg	age		336
Pro	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Leu	Gln	Ser	Leu	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Ser		
100									105						110		
cct	ctg	gtg	ttt	gtg	ccc	tcc	age	ccc	aga	ctc	agt	ccc	ttt	atg	cat		384
Pro	Leu	Phe	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Ser	Pro	Phe	Met	Ils			
115									120						125		
cca	ccc	age	cac	cac	tat	ctg	gaa	acc	act	tcc	aeg	ccc	gtt	tac	aga		432
Pro	Pro	Ser	His	His	Tyr	Leu	Glu	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Tyr	Arg		
130									135						140		
tcc	age	cac	cag	gga	gcc	tcc	agg	gag	gac	gac	tgc	ggc	tcc	egg	gag		480
Ser	Ser	His	Gln	Gly	Ala	Ser	Arg	Glu	Asp	Gln	Cys	Gly	Ser	Arg	Glu		
145									150						155		160
gac	aeg	tgc	age	ctg	ggg	gag	tta	ggc	gcc	gga	gcc	ggg	gtc	ggg	ggg		528
Asp	Thr	Cys	Ser	Leu	Gly	Glu	Leu	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly		
165									170						175		
ttt	gag	atg	gcc	aaa	gac	acg	egt	ttc	tgc	gcc	gtg	tgc	age	gac	tac		576
Phe	Glu	Met	Ala	Lys	Asp	Thr	Arg	Phe	Cys	Ala	Val	Cys	Ser	Asp	Tyr		
180									185						190		
gcc	tct	ggg	tac	cac	tat	ggg	gtg	tgg	tct	tgt	gag	ggc	tgc	aag	gcc		624

Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Trp Ser Cys Glu Gly Cys Lys Ala
 195 200 205
 Utc Itc aag agg age ate cag ggt cac aat gac tat atg tgc cca geg 672
 Phe Phe Lys Arg Ser Ile Gln Gly His Asn Asp Tyr Met Cys Pro Ala
 210 215 220
 acc aat cag tgc act att gac aga aat cga agg aag ggc tgt cag get 720
 Thr Asn Gln Cys Thr Ile Asp Arg Asn Arg Arg Lys Gly Cys Gln Ala
 225 230 235 240
 tgt cgt ctt agg aag tgt tac gaa gtg gga atg atg aaa gac ggt gtg 768
 Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Val Gly Met Met Lys Gly Gly Val
 245 250 255
 cgc aag gac cgc att cgc att tta cgg cgt gac aaa cgg cgg aca gac 816
 Arg Lys Asp Arg Ile Arg Ile Leu Arg Arg Asp Lys Arg Arg Thr Gly
 260 265 270
 gtt ggt gat gga gac aag gtt gta aag gat cag gag cat aaa aeg gtc 864
 Val Gly Asp Gly Asp Lys Val Val Lys Gly Gln Glu His Lys Thr Val
 275 280 285
 cat tat gat gga agg aaa cgc agc aca gca gga gga gga gga gga
 His Tyr Asp Gly Arg Lys Arg Ser Ser Thr Gly Gly Gly Gly Gly
 290 295 300
 gga gga gga aya ctg tct gtg acc age ata cct cct gag cag stg ctg 960
 Gly Gly Gly Arg Leu Ser Val Thr Ser Ile Pro Pro Glu Gln Val Leu
 305 310 315 320
 etc etc ctt cag ggc gcc gag ccc cgg ata etc tgc tgg cgt cag aag 1008
 Leu Leu Leu Gln Gly Ala Glu Pro Pro Ile Leu Cys Ser Arg Gln Lys
 325 330 335
 ttg age cga cgg lac aee gag gtc aee atg atg aee ctg etc acc age 1056
 Leu Ser Arg Pro Tyr Thr Glu Val Thr Met Met Thr Leu Leu Thr Ser
 340 345 350
 atg gca gac aag gag ctg gtc eac atg atc gec tgg gec aag aag etc 1104
 Met Ala Asp Lys Glu Leu Val His Met Ile Ala Trp Ala Lys Lys Leu
 355 360 365
 cca ggt ttt ctg cag ctg tcc ctg eac gat cag gtg ctg ctg ctg gag 1152
 Pro Gly Phe Leu Gln Leu Ser Leu His Asp Gln Val Leu Leu Leu Glu
 370 375 380
 age tgg tgg ctg gag gtg ctc atg atc ggc ctc att tgg agg age tcc ate 1200
 Ser Ser Trp Leu Glu Val Leu Met Ile Gly Leu Ile Trp Arg Ser Ile
 385 390 395 400
 eac tgt ccc ggg aag etc ate ttt gca caa gac etc ate ctg gag agg 1248
 His Cys Pro Gly Lys Leu Ile Phe Ala Gln Asp Leu Ile Leu Asp Arg
 405 410 415
 aat gag gca gac tgc gtg gaa ggc atg aeg gag ate ttc gac atg ctg 1296
 Asn Glu Gly Asp Cys Val Glu Gly Met Thr Glu Ile Phe Asp Met Leu
 420 425 430
 ctg gec act get tcc cgc ttc cgt gtg etc aaa ctc aaa cct gag gaa 1344
 Leu Ala Thr Ala Ser Arg Phe Arg Val Leu Lys Leu Lys Pro Glu Glu
 435 440 445
 ttc gtc tgc etc aaa get att att tta ctc aac tcc ggt get ttt tct 1392
 Phe Val Cys Leu Lys Ala Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Ala Phe Ser
 450 455 460

ttc tgc acc ggc acc alg gag cca ctt ccc aac age geg geg gtc cag Phe Cys Thr Gly Thr Met Glu Pro Leu Ile Asn Ser Ala Ala Val Gln 465 470 475 480	1110
age atg ctg gac acc alc aca gac gca ctc att cat tac ate agt cag Ser Met Leu Asp Thr Ile Thr Asp Ala Leu Ile His Tyr Ile Ser Gln 485 490 495	1488
tgc ggt tac ttg gcc cag gag cag ggc aga cgg cag gcc cgg ctc Ser Gly Tyr Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Glu Ala Gln Pro Leu 500 505 510	1536
ctg ctg ctc tcc cac alc agg cac atg age aac aaa ggc atg gag ccc Leu Leu Leu Ser His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His 515 520 525	1584
ctc tac age atg aag tgc aag aac aaa gtc cct ctt tat gac ctc cta Leu Tyr Ser Met Lys Cys Lys Asn Lys Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu 530 535 540	1632
ctg gag atg ctc gat gcc cac cgc ctg ccc ccc gtc aga gcc ccc Leu Glu Met Leu Asp Ala His Arg Leu His Pro Val Arg Ala Pro 545 550 555 560	1680
cag tcc ttg tcc caa gtc gac aga gac ctc ccc tec acc age age ggc Gln Ser Leu Ser Gln Val Asp Arg Asp Pro Pro Ser Thr Ser Ser Gly 565 570 575	1728
ggg ggt gga atc gct ccc ggt tet ata tec gca tet cga ggc aga atc Gly Gly Gly Ile Ala Pro Gly Ser Ile Ser Ala Ser Arg Gly Arg Ile 580 585 590	1776
gag agt ccc agc aga ggc ccc ttt gtc ccc agt gtc ctt cag tat gga Glu Ser Pro Ser Arg Gly Pro Phe Ala Pro Ser Val Leu Gln Tyr Gly 595 600 605	1824
ggg tcc cgt cct gac tgc aac ccc gcc ctt ccc gac tga Gly Ser Arg Pro Asp Cys Thr Pro Ala Leu Gln Asp 610 615 620	1863

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のエストロジエンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターの構築過程を示す図である。

【図2】本発明のエストロジエンレセプター遺伝子を発現させるための発現ベクターRSV-ERの構造を示す図である。pRC/RSVは構築に用いたベクターである。ERは本発明のエストロジエン遺伝子を、RSV-LTRはRSVプロモーターを、pSV40はSV40プロモーターを、Neomycinはネオマイシン耐性遺伝子をそれぞれ示す。

【図3】エストロジエン応答配列とレポーター遺伝子とを含むレポータープラスマミドERE-tK-pGL（図中ではERE-pGLと表示）の構築過程を示す図である。

【図4】エストロジエン応答配列とレポーター遺伝子とを含むレポータープラスマミドERE-tK-pGLの構造を示す図である。INERFはエストロジエン応答配列が1個連結された配列を意味し、tk promoterはTKプロモーターを、Amp^Rアンピシリン耐性遺伝子を示す。

【図5】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションの条件を検討した結果を示す図で

ある。上段の図は、トランスフェクション試薬にリボフェクチンを使用した場合、下段の図はリボフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図6】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するトランスフェクション試薬の量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リボフェクチンを使用した場合、下段の図はリボフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図7】レポーターアッセイ用の細胞を調製するためのトランスフェクションにおいて、添加するフラスミドの量を検討した結果を示す図である。上段の図は、リボフェクチンを使用した場合、下段の図はリボフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

【図8】レポーターアッセイにおけるβ-エストラジオールのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25μgのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15μgのレポーターフラスミドERE5-tK-pGL、および、0.1μgのコントロールレポーターフラスミドpRL-TKを導入した細胞を試験に用いた。上段の図は、トランスフェクション試薬にリボフェクチ

ンを使用した場合、下段の図はリボフェクトアミンを使用した場合の結果を示す。

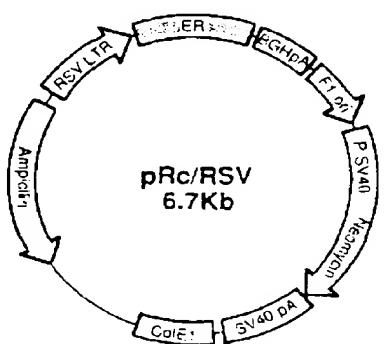
【図9】レポーター・アッセイにおけるβ-エストラジオールのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり $0.25\mu\text{g}$ のレセプター発現ベクターRSV-ER、 $0.15\mu\text{g}$ のレポータープラスマドERE5-tk-pGL、および、 $0.1\mu\text{g}$ のコントロールレポーター・プラスマドpRL-tKをリボフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。

【図10】レホーター・アッセイにおけるビスフェノールAのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25 μ gのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15 μ gのレホーターフラスマミドE RE5-tk-pGL、および、0.1 μ gのコントロールレポーター・アラスミドpRL-tKをリボフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E2は、終濃度500pMの β -エストラジオールが添加された系を示す。

【図1-1】レポーターアッセイにおけるローノニルフェノールのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり $0.25\mu\text{g}$ のレセプター発現ベクターRSV-ER、 $0.15\mu\text{g}$ のレポータープラスマドERE5-tk-pGL、および、 $0.1\mu\text{g}$ のコントロールレポータープラスマドpRL-tKをリボフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E-2は、終濃度500pMの β -エストラジオールが添加された系を示す。

【図1-2】レホーター・アッセイにおける酢酸トリブチルすずのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり0.25μgのレセプター発現ベクターRSV-ER、0.15μgのレボーター・プラスミドERE5-tk-pGL、および、0.1μgのコントロールレホー

【图2】

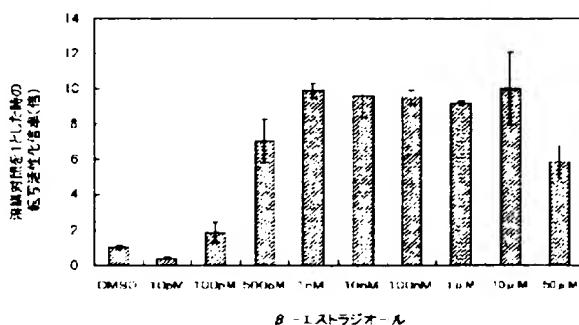


ターフラスミドpHL-TKをリホフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E-2は、終濃度500pMの β -エストラジオールが添加された系を示す。

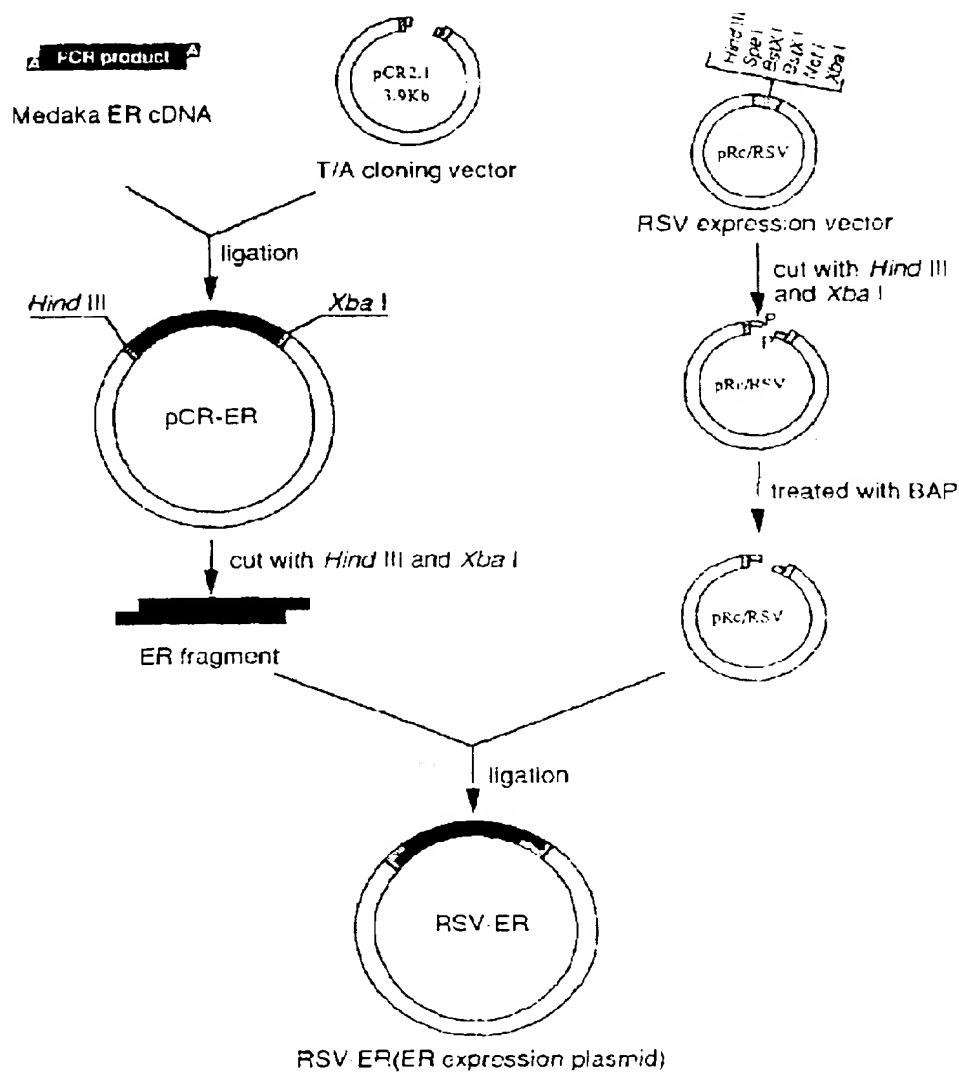
【図13】レポーター・アッセイにおけるフタル酸ジ-2-エチルヘキシルのエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり $0.25\mu\text{g}$ のレセプター発現ベクターRSV-ER、 $0.15\mu\text{g}$ のレポーター・プラスミドERE5-tk-pGL、および、 $0.1\mu\text{g}$ のコントロールレポーター・プラスミドpRL-tkをリボフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。E-2は、終濃度 $50\text{ }\mu\text{M}$ の β -エストラジオールが添加された系を示す。

【図14】レポーター・アッセイにおける各種化合物のエストロジエンレセプター活性化能を測定した結果を示す図である。1ウェルあたり $0.25\mu\text{g}$ のレセプター発現ベクター-*RSV-ER*、 $0.15\mu\text{g}$ のレポーター・プラスミド*ERE5-tk-pGL*、および、 $0.1\mu\text{g}$ のコントロールレポーターフラスマト*PRL-tk*をリホフェクタミンを用いて導入した細胞を試験に用いた。*E-2*は終濃度 500pM の β -エストラジオールが添加された系を、*Tis*は終濃度 $50\mu\text{M}$ の酢酸トリブチルすずが添加された系を、*BisAl*は終濃度 $50\mu\text{M}$ のビスフェノールAが添加された系を、*Di-2*は終濃度 $50\mu\text{M}$ のフタル酸ジーエチルヘキシルが添加された系を、*Noxy*は終濃度 $50\mu\text{M}$ のノニルフェノールが添加された系を示す。顕微鏡観察により判定された死亡細胞率は、酢酸トリブチルすずが添加された系において 90% 以上、ビスフェノールAが添加された系において 0% 、フタル酸ジーエチルヘキシルが添加された系において 90% 以上、ノニルフェノールが添加された系において 40% 前後であった。

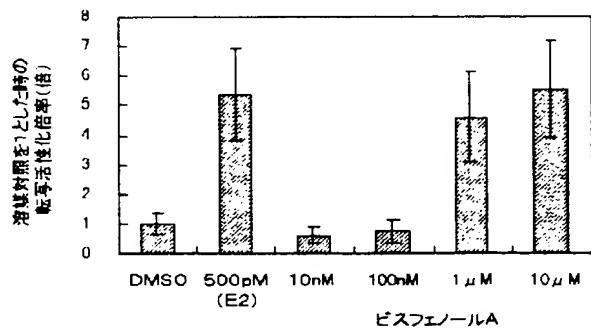
【五】



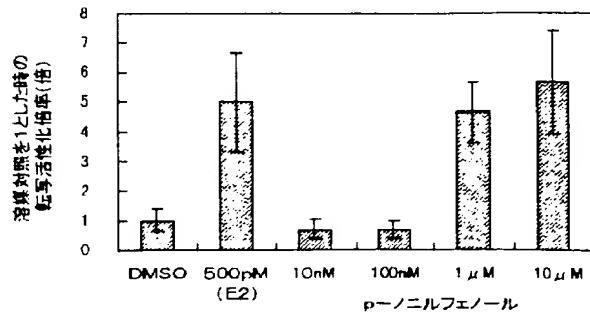
【図1】



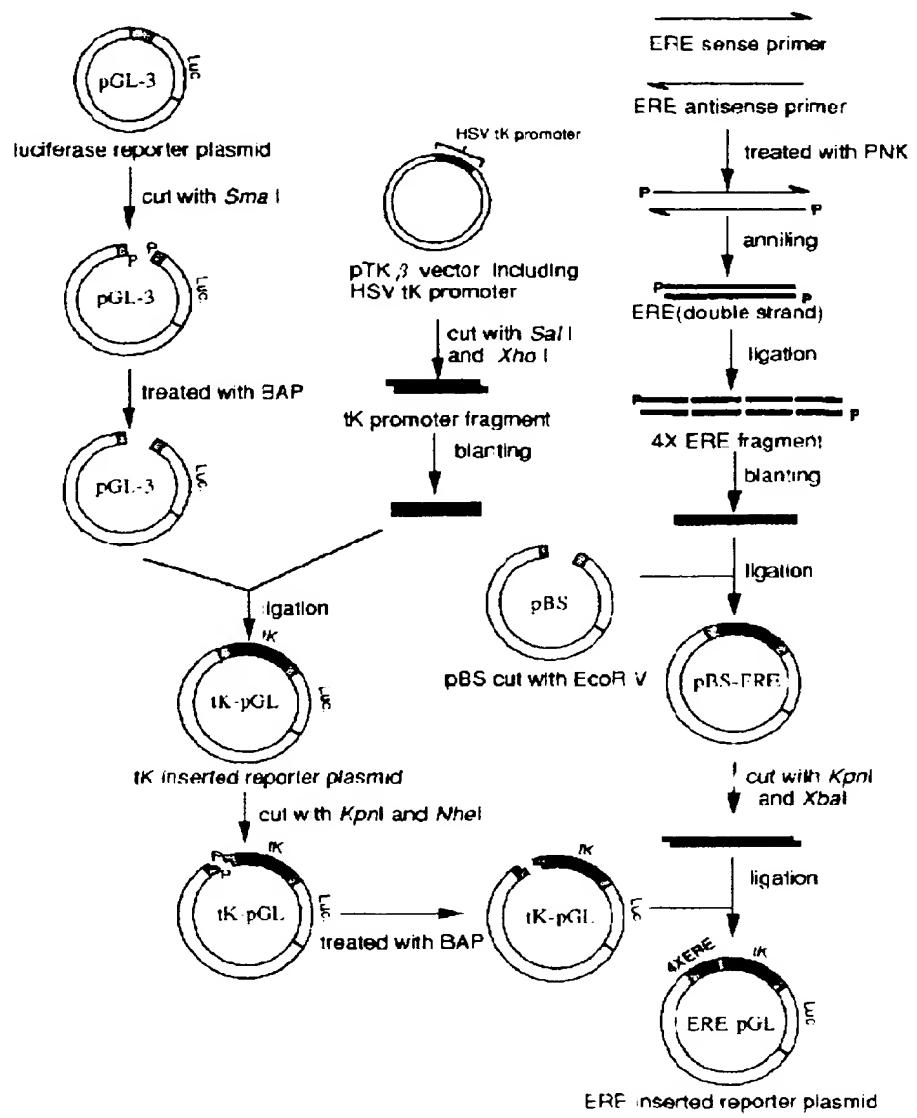
【図10】



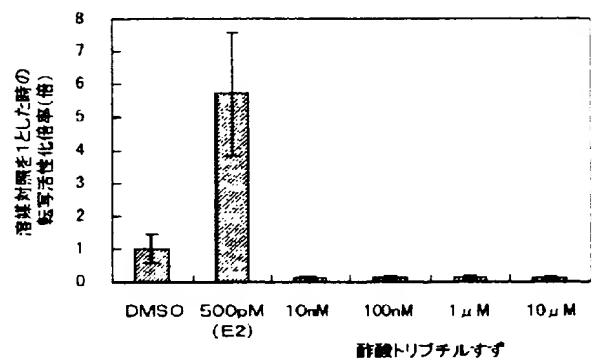
【図11】



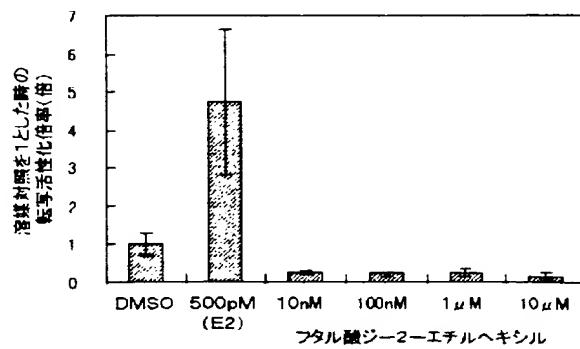
【図3】



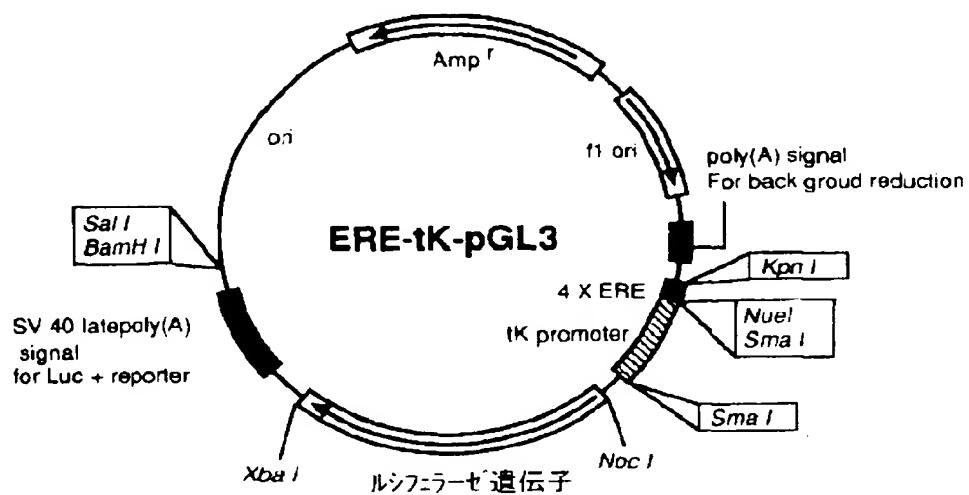
【図12】



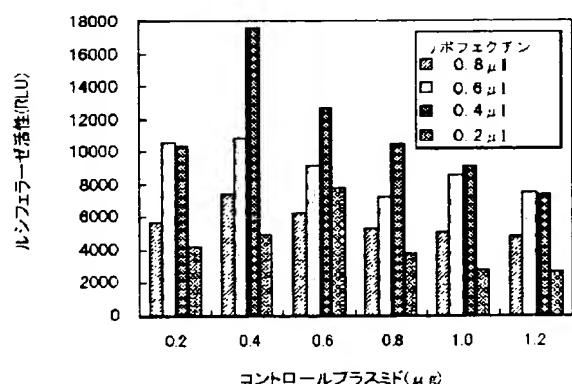
【図13】



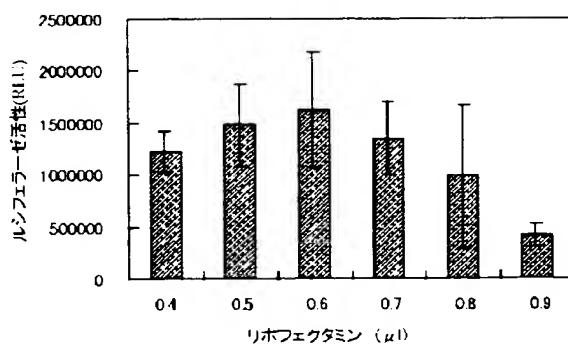
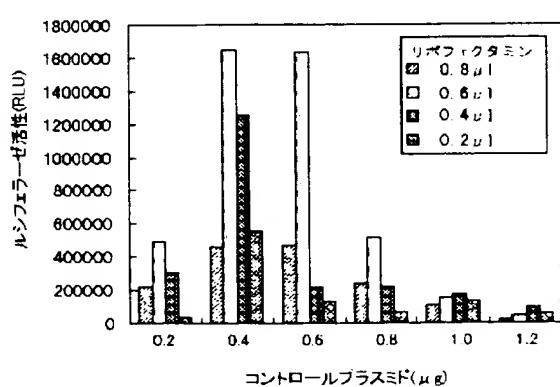
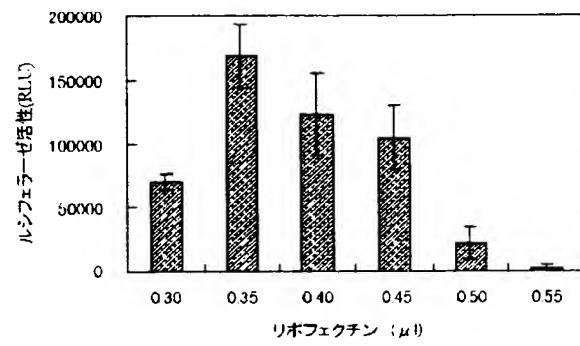
【図4】



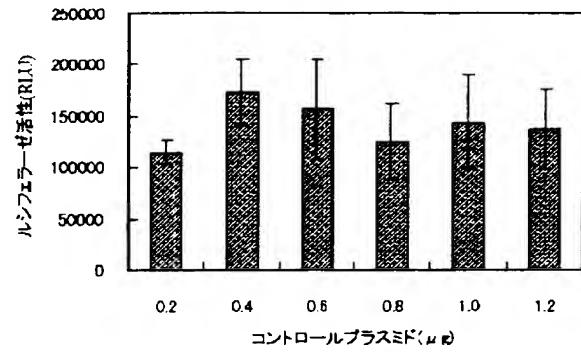
【図5】



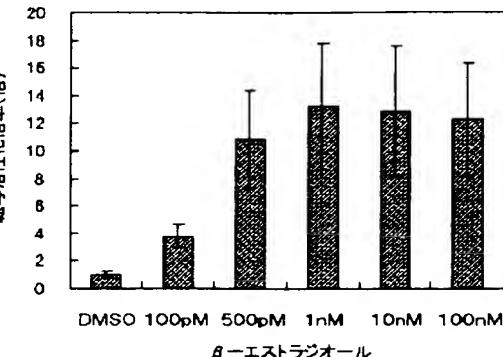
【図6】



【图7】



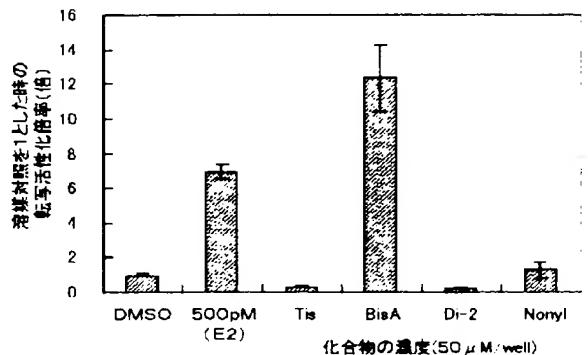
【图8】



コントロールプラスミド(μg)	ルシフェラーゼ活性(RLU)
0.2	~350,000
0.4	~2,200,000
0.6	~1,750,000
0.8	~1,350,000
1.0	~1,200,000
1.2	~600,000

Concentration (nM)	Proliferation Rate (Relative)
DMSO	~1.0
100pM	~3.5
500pPM	~13.0
1nM	~22.5
10nM	~23.0
100nM	~22.5

【图1-4】



フロントページの統一

(51) Int. Cl. 7
// (C 1 2 N 15/09
C 1 2 R 1:91)
(C 1 2 P 21/02
C 1 2 R 1:91)

識別記号
ZNA

F-1

七-四-下 (参考)

(23) 00-201688 (P2000-2048

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA17 AA20 BA63 DA02
EA04 FA02 FA10 GA13 HA03
HA11
4B063 QA01 QQ22 QQ61 QQ75 QQ91
QQ94 QR33 QR60 QR77 QR80
QS36 QX02
4B064 AG20 CA10 CM19 CC24 DA13
DA16
4B065 AA90Y AA93X AB01 AC14
BA05 CA46
4B045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA52
DA50 EA50 FA72 FA74 HA06